

# PROLYL ENDOPEPTIDASE INHIBITOR

Publication number: JP5331072 (A)

Also published as:

Publication date: 1993-12-14

 JP3318622 (B2)

Inventor(s): MARUYAMA GUSUMU, TANAKA HIDEOKI; MAEDA HIDEKATSU; MITSUYOSHI SHINSUKE \*

Applicant(s): AGENCY IND SCIENCE TECHN; SHOWA SANGYO CO \*

Classification:

- international: A61K38/55; A61P25/28; A61P3/00; A61P43/00; C07K14/81; C07K5/10; C07K7/06; C07K7/08; C12N9/99; A61K38/55; A61P25/00; A61P3/00; A61P43/00; C07K14/81; C07K5/00; C07K7/00; C12N9/98; (IPC1-T); A61K37/64; C07K5/10; C07K7/06; C07K7/08; C07K99/00; C12N9/99

- European:

Application number: JP19920160354 19920527

Priority number(s): JP19920160354 19920527

Abstract of JP 5331072 (A)

**PURPOSE:** To provide a new and useful prolyl endopeptidase inhibitor promising its use in medicines and/or foods useful for preventing and/or curing dementia. **CONSTITUTION:** The inhibitor containing, as active ingredient, at least one kind of the peptides each composed of L-amino acids described blow and their acid-addition salts thereof; namely: Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile, and Thr-Pro-Pro-Val.

.....  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

特開平5-331072

(43)公開日 平成5年(1993)12月14日

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 37/64	ADD	8314-4C		
C 1 2 N 9/99				
// C 0 7 K 5/10	Z NA	8018-4H		
7/06	Z	8318-4H		
7/08		8318-4H		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-160354	(71)出願人	000001144 工業技術院長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
(22)出願日	平成4年(1992)5月27日	(74)上記1名の復代理人	弁理士 坂口 昇造 (外1名)
		(71)出願人	000187079 昭和産業株式会社 東京都千代田区内神田2丁目2番1号
		(74)上記1名の代理人	弁理士 坂口 昇造
		(72)発明者	丸山 進 茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤

(57)【要約】

【目的】 新規かつ有用なプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の提供

【構成】 L体のアミノ酸から構成される下記のペプチド及びその酸付加塩の少なくとも1種を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤:

Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His,  
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His,  
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-  
Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-  
-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile及び Thr-Pro-  
-Pro-Val。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 L体のアミノ酸から構成される下記ペプチド及びその酸付加塩の少なくとも1種を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤；

Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His, His-Leu-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile及び Thr-Pro-Pro-Val.

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明はプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤に関し、さらに詳しくは近年増加の傾向にある対策が望まれている痴呆症の予防及び／または治療に有用な医薬品又は食品に利用できることが期待されているプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤に関するものである。

##### 【0002】

【従来の技術】プロリルエンドペプチダーゼ (EC 3.4.21.26) は、最初、オキシトシン不活性化酵素として1971年にWalterらによってヒト子宮中に発見され、その後、子ビツジやウシ脳から単一に精製された (Science 173, 827 (1971), Molecular & Cellular Biochemistry 30, 111 (1980), 日本農芸化学会誌 58, 1147 (1984))。また、同様の酵素が *Flavobacterium* 属細菌からも発見されている (J. Biol. Chem. 255, 4796 (1980))。一方、脳内では、パソプレシン及びバソプレシン誘導体 [pGlu<sup>4</sup>, Cyt<sup>6</sup>] AVP-(4-9) の存在が確認されているが、これらのペプチドはステップスルー型受動的回避学習法で記憶保持活性があるとされている (Science 221, 1310 (1983), Nature 308, 276 (1984))。

【0003】 芳本と鶴は、記憶の固定場所とされている脳の海馬部分にプロリルエンドペプチダーゼの高い活性が観察されたことと、バソプレシンが必要以上に分解され、記憶保持に障害が現れると考え、Z-Gly-Pro-CH<sub>2</sub>Cl, Z-Pro-prolinol, Z-Val-prolinol, Boc-Pro-prolinolなどのプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤を合成し、これらが抗健忘作用を示すことを確認した (日本農芸化学会誌 58 (111), 1147 (1984)、化学と生物 25 (9), 554 (1987))。また最近では、微生物や食品成分に由来するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤も発見されている (Agric. Biol. Chem. 55, 825 (1991)、特開平 3-31298、1990年薬学会年會講演要旨集 p. 119)。

【0004】 一方、トウモロコシ、大豆、ニンジンなどの植物は、プロリンを多く含む蛋白質を生産しており、

それらには Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu, Pro-Pro-Val-Tyr-Ile, Pro-Pro-Ile-Tyr-Lys, Pro-Pro-Val-Tyr-Thr, Pro-Pro-Val-His-Lys などアミノ酸5～6残基のペプチドが繰り返し配列として存在している (The Journal of Biological Chemistry 262, 8367 (1987))。特に、トウモロコシ蛋白質はプロタミンを50～60%、グルテリンを35～40%含む、主成分であるプロタミンはゼイン (zein) と呼ばれる。ゼインはα、β、γの3種に分けられ (J. Cereal Sci. 5, 117 (1967))、γ-ゼイン中には Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu を基本単位とする6回繰り返し構造及びプロリンが1つ置きに並んだ配列 Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro が含まれている (Nucleic Acids Res. 13 (5), 1493 (1985))。

##### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明はプロリルエンドペプチダーゼ阻害作用を有し、従って痴呆症治療及び／または予防薬として、または日常の摂取を通して痴呆症等の症状の予防を図る機能性食品として有用であることが期待される特定のペプチド系プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤を提供することを目的とする。

##### 【0006】

【課題を解決するための手段】多くのプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤は分子中にプロリン (Pro) を有し、また幾つかの食用植物は、プロリンを多く含む蛋白質を生産しており、それらには、Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu, Pro-Pro-Val-Tyr-Lys, Pro-Pro-Ile-Tyr-Lys, Pro-Pro-Val-Ile-Tyr-Thr, Pro-Pro-Val-His-Lys などアミノ酸5～6残基のペプチドが繰り返し配列として存在している。本発明者らはこれらの事実より、植物蛋白質を蛋白質分解酵素 (プロテアーゼ) で処理することにより、プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤を安価に大量生産できる可能性があると考え、上記繰り返し配列に関連した種々のペプチドを化学合成し、それらのプロリルエンドペプチダーゼに対する作用を調査した。その結果、下記ペプチドがプロリルエンドペプチダーゼを阻害することを見い出した。

【0007】 すなわち、本発明はL体のアミノ酸から構成される下記ペプチド及びその酸付加塩の少なくとも1種を有効成分として含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤；

Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His, His-Leu-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile, 及び Thr-Pro-Pro-Val に関する。

【0008】 ここで酸付加塩は、製薬上許容される酸 (無機酸及び有機酸) 付加塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、酢酸塩、安息香酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、クエン酸

塩、シュウ酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等を含む。また付加する酸の当量は、0 当量より大からペプチド中の塩基性アミノ酸残基、His、Arg、Lys の総数 + 1 と等しい当量まで可能である。

【0009】本願の特許請求の範囲中のペプチドは既知の植物蛋白質の配列中に存在するが、そのフラグメントであってかつ未だ知られていなかった有用性を有する。かかる観点からアンジオテンシン変換酵素阻害剤等として既知のものを除いた下記ペプチドは本発明者らの知る限りにおいて新規化合物である：

His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile 及び Thr-Pro-Pro-Val,

なお、本願の特許請求の範囲のペプチド中、Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro, Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His 及び His-Leu-Pro-Pro-Val は公知である (特開平 2-36127, Agric. Biol. Chem. 53, 1077 (1989))。

【0010】本発明で使用するペプチドは通常有機化学的な合成方法によりアミノ酸を段階的に導入する方法、または天然蛋白質の酵素加水分解法により製造されるが、また、加水分解酵素の逆反応を利用したペプチド合成法、遺伝子工学的な方法等によって製造することも可能である。これまで多くのペプチド合成方法が知られており、例えば泉屋信夫、加藤哲夫、青柳東彦、越道典、「ペプチド合成の基礎と実験」丸善 (株) に詳細に記載されている。本発明で用いるペプチドはこれらの合成法のいずれかによって、例えばいわゆる固相ペプチド合成または液相ペプチド合成によって製造することができる。

【0011】液相ペプチド合成は上述の「ペプチド合成の基礎と実験」に記載されており、それにしたがって、たとえば本ペプチドのC末端に位置するべきアミノ酸であってそのカルボキシル基がベンジル基 (Bzl)、t-ブチル基 (t-Bu) 等で保護されたアミノ酸とC末端アミノ酸に隣接して位置するべきアミノ酸であってそのα-アミノ基がt-ブチルカルボキシル基 (Boc)、ベンジロキシカルボニル基 (z) 等で保護されたアミノ酸をジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルアセトアミド等に溶解し、それらをジクロロヘキシルカルボジイミド (DCO) 及び t-ブチロキシベンゾトリアゾール (HOBT) の存在下室温で一夜反応させることによって行うことができる。ついで生成物のα-アミノ基の常法による除去の後に得られるジペプチドをα-アミノ保護した第3のα-アミノ酸と同様に反応してα-アミノ保護基を除去し、ついで同様な手順を繰り返して本ペプチドを得る。反応させるα-アミノ酸が反応に関与すべきでないα位以外のα-アミノ基、グアニジノ基またはイミダゾリル基を有する場合には、これらの基は一般に反応に先立って保護すべきである。アル

コール性ヒドロキシル基の保護基 Bzl 等を含む、α位以外のα-アミノ基の保護基はα-アミノ基の保護基として述べたものを含む、グアニジノ基の保護基はトシル基 (Tos) 等を含む、イミダゾリル基の保護基は Tos 等を含む。これらの保護基の導入は常法によって、例えば上述の「ペプチド合成の基礎と実験」に記載されたように行うことができる。最終反応の終了後、これらの保護基を除去するが、これらの脱保護は常法によって、例えば上述の「ペプチド合成の基礎と実験」に記載されたように行うことができる。例えば、α-アミノ保護基については Boc は t-ブチロキシカルボネート (TFA) または塩酸によって、Z は接触還元によって、カルボキシル保護基については、Bzl は、例えば、接触還元によって、t-Bu は TFA または HCl/ジオキサンによって除去することができる。さらに、アルコール性ヒドロキシル基については、Bzl は、例えば、接触還元またはHFによって、グアニジノ及びイミダゾリル保護基については Tos は Na/NH<sub>3</sub> または HF によって除去することができる。

【0012】一方、固相ペプチド合成については、ペプチドシンセサイザー (例えばアブライドバイオシステムズ社によって生産された 430 A 型ペプチドシンセサイザー) を用いる合成が最近広く用いられている。すなわち、この方法においては基本的に、α-アミノ基が Boc で保護されたα-アミノ酸 (Boc-α-アミノ酸) を、出発物質としての、例えば、L-Pro が結合したフェニルセトアミドメチル (PAM) 樹脂、すなわち、L-Pro-O-CH<sub>2</sub>-PAM (アブライドバイオシステムズ社より入手し得る) の N-側からペプチドと Boc の除去の繰り返しによって段階的に延長する。Boc-Arg(Mts) (Mts はメチレン-2-スルホン酸である) 及び Boc-L-Gln は中間体として t-ブチロキシベンゾトリアゾール (HOBT) を経由する延長反応に付し、他の Boc-α-アミノ酸は中間体として DCC を使用する対称無水物を経由する延長反応に付す。上記 Boc-α-アミノ酸においては、反応性官能基がある場合には、一般にそれを適当な保護基によって保護すべきである。本発明に関して保護 Boc-α-アミノ酸の例は Boc-L-Arg(Mts)、Boc-L-Lys (Cl-Z) (Cl-Z は 4-クロロベンジルオキシカルボニルである)、Boc-L-Thr (Bzl)、Boc-L-His (BAP) (BAP は 2, 4-ジニトロフェニルである) 等である。

【0013】430 A 型ペプチドシンセサイザーを用いる合成系においては、α-アミノ酸物質以外に以下の試薬及び溶媒を用いる：N-トリゾルビルエチルアミン (TFA ニュートライザー)、TFA (Boc 切断)、MeOH (生成した炭素化合物の溶解及び除去)、HOBT (0.5M HOBT/DMF)、DCC (0.5M DCC/ジクロロメタン (DCM)、DCM 及び DMF (溶媒、ニュートライザー (70% エタノール/アミン、29.5% メタノール) (溶媒の中和)、α-アミノ酸物質及びこれらの試薬及び溶媒を定められた所に装填する。これらの物質の使用はペプチドシンセサイザーによって自動的に行われる。反応温度及び時間の設定も自動的に行われる。

なされるが、反応温度は通常室温である。上記手段によってペプチド中の反応性官能基が保護されたペプチド- $O-CH_2-PAM$ が得られる。上記固相ペプチド合成の実験の操作はアブライドバイオシステムズ社による430A型ペプチドシンセサイザーユーザーズマニュアル (Part Number 900066, Version 1.3B, July 1, 1968) に従って行なった。

【0014】得られた反応性官能基が保護されたペプチド- $O-CH_2-PAM$ を常法に従って、例えば上述の「ペプチド合成の基礎と実験」または430A型ペプチドシンセサイザーユーザーズマニュアルに記述されたようにして、例えば保護基の切断によって生じるカチオンを捕獲するためのスカベンジャーとしてのチオアニオール及び/またはエンタジチオールの存在下にトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMSA) をTFMSA の希釈剤としての TFA と共に用いて処理して樹脂及び保護基を切断しそれによって目的とするペプチドを得る。上記 TFMSA 法において、保護されたペプチド- $O-CH_2-PAM$  類似の残基を有する場合には、これをチオフェノールによる DMP の除去の後上記処理に付す。また、例えば (株) ペプチド研究所製のフッ化水素装置に反応性官能基が保護されたペプチド- $O-CH_2-PAM$ 、アニオール及びフッ化水素を導入し、 $-2^{\circ}C$  で1時間の反応を行った後、フッ化水素の除去とエーテルによる洗浄を行うことにより目的とするペプチドを得ることもできる。

【0015】本発明のプロリルエンドペプチダーゼ阻害剤中の有効成分として使用し得るペプチド中、His-Leu-Pro-Pro-Val、His-Leu-Pro-Pro-Val、His-Leu-Pro-Pro-Val、Leu-Pro-Pro-Pro-Val、Pro-Pro-Pro-Val、及び Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro はトウモロコシ蛋白質 ユーゼインをズプチリシン、ペプシン、パバインまたは類似の基質を有するプロテアーゼで酵素的にあるいは酸で加水分解することによって得ることができる。本酵素反応は通常単に水中または緩衝液 (例えば、トリス-HCl 緩衝液またはリン酸緩衝液) 中で行う。

【0016】使用するユーゼインはユーゼイン単独であってもよいし、ユーゼインの他に  $\alpha$ -ユーゼイン、 $\beta$ -ユーゼインを含む混合物であってもよい。これらのゼインは市販のものでもよいし、またコーンスターチの製造過程で得られるとうもろこし蛋白質から分離したゼイン、またはそれから知的手法で分離した (Plant Physiol., 80623 (1986)) ユーゼインであってもよい。また特開平2-36127の参考例1にユーゼインの製造例が示されている。使用される酵素はズプチリシン、パバインまたはペプシンである。

【0017】蛋白質基質の濃度は攪拌及び混合を行うことが可能である限り、特に限定されないが、攪拌を容易にする、2-20% (w/v) の範囲にあることが好ましい。酵素サモライシンの添加量はその方価によって変

化するが、蛋白質に基づいて通常0.01重量%以上、好ましくは0.1~10重量%であるのが適当である。酵素の一部を反応の途中で加えることも可能である。反応のpH及び温度は使用酵素の最適温度付近であればよく、ズプチリシンはpH6~9、温度30~70 $^{\circ}C$ 、パバイン及びペプシンはpH5~8、温度30~60 $^{\circ}C$ が適当である。反応時間は酵素の種類、添加量、反応温度、反応pHによって異なるため一定ではないが、通常は1~40時間程度である。加水分解反応の停止は公知の方法によって、例えば、加水分解物の加熱によるクエン酸、リンゴ酸等の有機酸、塩酸、リン酸等の無機酸または水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリの添加によるpH変化による酵素の不活性化によって、または限外濾過膜等を用いる濾過による分離によって行うことができる。

【0018】得られる加水分解物溶液を次いで固液分離 (例えば、遠心分離または濾過) に付し、得られる液体を限外濾過、ゲル濾過等によって分画して10000以下の分子量を有する液体を得る。この液体は本発明の目的ペプチドを含有し、この液体またはその濃縮物 (例えば、凍結乾燥物) をさらに分画して各目的ペプチドを得る。本発明においては上記凍結乾燥物をユーゼイン凍結乾燥物と称し、それを用いる場合についてさらに説明する。ユーゼイン凍結乾燥物をまずアニオン交換樹脂、例えば弱塩基性アニオン交換樹脂 (例えば、東ソー (株) 製 DEAE トヨパール6500) による処理、またはカチオン交換樹脂、例えば、弱酸性カチオン交換樹脂 (例えば、東ソー (株) 製 SP-トヨパール6500) による処理に付す。

【0019】ユーゼイン凍結乾燥物を最初にアニオン交換樹脂に通す分画方法においては、各ペプチドを直線濃度勾配溶出 (例えば、DEAE トヨパール 6500 使用の場合にはトリス緩衝液一適当な濃度の、トリス緩衝液中のNaCl) によって分画する。溶出液をいくつかの画分に取り、各々をゲル濾過 (例えば、セファデックス LH-20 使用)、カチオン交換樹脂処理 (例えば、SP-トヨパール6500 使用)、逆相HPLC (例えば、資生堂 (株) 製のオクタデシルシランの商品名であるカプセルパックC<sub>18</sub> またはセンシユウ化学 (株) 製のオクタデシルシランの商品名であるセンシユウパック1251-Y) 等に付して個々のペプチドに分離する。また、簡単に、後記実施例2に例示される如く、上記10000以下の分子量を有する液体を濃縮し、HPLCによって化学合成した本ペプチドと同位置に溶出されてくるペプチドを分取することによって各ペプチドを得ることもできる。

【0020】本ペプチドの酸付加量は常法によって製造することができる。例えば、酸付加量は本ペプチドとそれに対し0当量より大からそこに含まれる塩基アミノ酸残基の総数+1当量までの量の酸とを水中で反応させて、生成物を凍結乾燥することによって得ることができる。また、本発明における製造過程で酸付加量として得られる場合もある。

【0021】本ペプチド及びその酸付加塩はプロリルエンドペプチダーゼ阻害作用を有し、ヒトの癌瘍症の治療、予防に有効であると期待される。本ペプチド及びその酸付加塩はそのまま、または通常少なくとも1つの製剤補助剤と製薬組成物にして使用する。本ペプチド及びその酸付加塩は経口剤（すなわち、経静注射、直腸投与等）または経口的に投与し、各投与方法に適した形態に製剤することができる。

【0022】注射剤としての製剤形態は、通常滅菌水溶液を包含する。上記形態の製剤はまた緩衝剤pH調節剤（リン酸水素ナトリウム、クエン酸等）、等張化剤（塩化ナトリウム、グルコース等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピル等）等の水以外の他の製薬補助剤を含有することができる。該製剤は細菌保持フィルタを通過し、組成物への殺菌剤の混入、組成物の照射や加熱によって滅菌することができる。該製剤はまたは殺菌剤組成物として製造し、用時滅菌水等に溶解して使用することもできる。

【0023】経口投与剤は胃腸器官による吸収に適した形態に製剤する。錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、粉末剤は常用の製薬補助剤、例えば結合剤（シロップ、アラビガム、ゼラチン、ソルベツト、トラガカン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース等）、賦形剤（ラクトース、スクロース、コンスターチ、リン酸カルシウム、ソルベツト、グリシン等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ等）、崩壊剤（ポテスター、カルボキシメチルセルロース等）、潤滑剤（ラウリル硫酸ナトリウム等）を包含することができる。錠剤は常法によりコーティングすることができる。経口液剤は水溶液等にした、ドライブログトにすることができる。そのような経口液剤は常用の添加剤例えば保存剤（p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピル、ソルビン酸等）を包含しているもよい。

【0024】本プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤中の本ペプチドまたはその酸付加塩の量は種々変えることができるが、通常5〜100%(w/w)、特に10〜60%(w/w)が適当である。本プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤の投与量は有効成分として10〜200mg/kg/dayが適当である。なお、本ペプチドの急性毒性はLD<sub>50</sub>（ICR系マウス、経口投与）>3g/kgである。

【0025】また、本ペプチドは多量に摂取しても生体に悪影響を与えない利点を有することから、そのまま、または種々の栄養分等を加えて、もしくは飲食品中に含ませしめて抗癌作用、癌瘍予防の機能を果たした機能性食品、健康食品として食してもよい。すなわち、例えば各種ビタミン類、ミネラル類等の栄養分を加えて、例えば栄養ドリンク、豆乳、スープ等の液状の食品や各種形状の固形食品、さらには粉末状としてそのままあるいは各種食品へ添加して用いることもできる。かかる機

能性食品、健康食品としての本プロリルエンドペプチダーゼ阻害剤中の有効成分の含有量、摂取量はそれぞれ上記製薬における含有量、投与量と同様であり。

## 【0026】

【実施例】次に本発明を実施例により説明する。

実施例1 His-Leu-Pro-Pro-Val の合成とプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性

a) His-Leu-Pro-Pro-Val の合成  
アブライド・バイオシステムズ社製ペプチド合成装置（430A型）に0.5ミリモルの Boc-Val-O-CH<sub>2</sub>-PM樹脂及び各2ミリモルのBoc-His(Tos)、Boc-Leu、Boc-Proを充填し、DCCによる無水対称法により His-(Tos)-Leu-Pro-Pro-Val-O-CH<sub>2</sub>-PMを合成した。なお、Tosはトリル基を示す。次に、ペプチド研究所製フッ化水素装置に上記合成ペプチド樹脂を導入し、アニソール1.5mlを添加後、フッ化水素10mlを導入了。-2℃、1時間の反応後、フッ化水素を減圧下に除去し、ペプチドを無水エーテル、クロロホルムで交互に3回洗浄し、2N酢酸60mlにペプチドを溶解させ、凍結乾燥した。この方法により His-Leu-Pro-Pro-Val の白色粉末 130mgを得た。次いで本ペプチドを高濃度液体クロマトグラフィー(HPLC)により精製した。

【0027】HPLCによる精製条件を下記に示す。

カラム：メルク社製 LiChosorb RP-SelectB (250 x φ25mm)

溶出液：0.1%トリフルオロ酢酸を含む3.5〜67% アセトニトリルのグラジエント

流速：1ml/min

本ペプチドの各種分析値を後記表1に示す。なお、アミノ酸分析は6N塩酸 110℃、24時間の加水分解後、日立835型アミノ酸分析装置により行った。また、質量分析は日本電子製HX-110型質量分析装置によるFAB-MS法で行った。

【0028】b) Val-His-Leu-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Val-His, His-Leu-Pro-Pro-Val, His-Leu-Pro-Pro-Val-His-Leu-Pro-Pro-Val, Leu-Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Pro-Pro-Val, Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-Pro-Gln-Pro-His-Pro, Lys-Pro-Pro-Val, Lys-Pro-Pro-Ile, Thr-Pro-Pro-Val の合成

His-Leu-Pro-Pro-Val の合成と同様にアブライド・バイオシステムズ社製ペプチド合成装置（430A型）を使用した。DCCによる無水対称法により合成し、フッ化水素により保護基と樹脂を切断した。ペプチドの精製条件も前述と同一である。これらのペプチドの各種分析値を後記表1に示す。

【0029】c) プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性の測定

以上のようにして得たペプチドのプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を以下のごとく測定した。

c-1) 微生物由来プロリルエンドペプチダーゼに対する

# 阻害活性の測定

生化学工業(株)より購入した*F.meningosepticum* 由来プロリルエンドペプチダーゼを pH7.0 の 0.1M リン酸緩衝液に溶解し、0.1unit/ml の酵素溶液とした。また、2 mM Z-Gly-Pro-pNA (パッケム社製、Z はベンジルオキシカルボニル基、pNA はパラニトロアニリドを示す)を上記リン酸緩衝液(40%ジオキサンを含む)に溶解し基質溶液とした。上記の各種ペプチドの水溶液をそれぞれ 1.5ml 容量のプラスチックチューブに 40  $\mu$ l 入れ、これにリン酸緩衝液 80  $\mu$ l、基質溶液 40  $\mu$ l を添加し、30℃で10分間保温した後、上記プロリルエンドペプチダーゼ溶液 40  $\mu$ l を加えよく混合して、30℃で10分間の反応を行った。その後、1 N HCl 200  $\mu$ l を添加することにより反応を停止させた。反応停止後、酵素反応により遊離してくるパラニトロアニリンを HPLC により定量した。HPLC 測定条件は以下の通りである。

## 【0030】HPLC 測定条件

カラム：ウオータース社製  $\mu$ Bondasphere 5  $\mu$  CR-300A (150 x  $\phi$  3.9mm)  
溶出：0.1%トリフルオロ酢酸を含む 53% アセトニトリル  
検出：410nm の吸収  
この様な実験を複数行い、阻害率を次の式より算出した。

$$\text{阻害率} = \frac{A}{A_0} \times 100 (\%)$$

A：阻害剤を含まない場合のパラニトロアニリンのピーク面積

B：阻害剤添加の場合のパラニトロアニリンのピーク面積

その結果を後記表 2 に示す。また、阻害率 50% のときのペプチドの濃度を  $IC_{50}$  値とし、それを後記表 3 に示す。

【0031】c-2) 牛脂由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性の測定  
牛脂アセトンパウダー(シグマ社製)25g を 10ml EDTA 及

び 10mM 2-メルカプトエタノールを含む 20mM Tris-HCl 緩衝液(pH7.0)200ml に溶解させ、16,000rpm、20分の遠心を行い、上清を回収した。洗いで、DEAE-トヨソール(東ソー)によるカラムクロマトグラフィーにてプロリルエンドペプチダーゼを部分精製し、0.1unit/ml の酵素溶液とした。また、2 mM Z-Gly-Pro-pNA を上記 Tris-HCl 緩衝液(40%ジオキサンを含む)に溶解し基質溶液とした。上記の各種ペプチドの水溶液をそれぞれ 1.5ml 容量のプラスチックチューブに 40  $\mu$ l 入れ、これにリン酸緩衝液 80  $\mu$ l、基質溶液 40  $\mu$ l を添加し、37℃で10分間保温した後、上記プロリルエンドペプチダーゼ溶液 40  $\mu$ l を加えよく混合して、37℃で10分間の反応させた。以下の測定条件は微生物由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性の測定の場合と同一であり、その結果を後記表 4 に示す。

## 【0032】実施例 2 $\gamma$ -ゼインからの His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val の生成

$\gamma$ -ゼイン 0.2g を 50mM Tris-HCl (pH8.2) 12ml 中に分散させ、これにズプチリン・カールズベルグ(シグマ社製)10mg を加えた。37℃18時間の反応後、分子量 10,000 の限外濾過膜(ミリポア社製モルカット)に付して通過する低分子量ペプチドを回収した。これを濃縮して、HPLC において、化学合成した His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val と同位置に溶出されてくるペプチドを分取し回収した。HPLC の条件は以下の通りである。

### HPLC の分離条件

カラム：メルク社製 Superspher RP-8 (125 x  $\phi$  4mm)  
溶出：0.1%トリフルオロ酢酸を含む 7~63% アセトニトリルグラジエント  
検出：210nm の紫外吸収  
回収したペプチド溶液は、減圧乾燥し最終標品とした。

## 【0033】

### 【表 1】

## 合成ペプチドの分析値

ペプチド	$\frac{[\alpha]_D^{25}}{(H_2O)}$	アミノ酸分析値 (組成比)	質量分析値 FAB-MS (m/z)
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	-192 (C=0.4)	Val 1.00, His 0.98, Leu 1.04, Pro 3.11	659 (M-H) <sup>+</sup>
Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	-228 (C=0.2)	Leu 1.00, Pro 3.05, Val 1.00, His 1.03	659 (M-H) <sup>+</sup>
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	-218 (C=0.3)	His 1.00, Leu 1.06, Pro 2.92, Val 1.00	659 (M-H) <sup>+</sup>
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-	-242	His 0.81, Leu 1.09, Pro 3.09, Val 1.00	1299 (M-H) <sup>+</sup>
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	(C=0.1)		

Leu-Pro-Pro-Pro-Val	-238 (C=0.3)	Leu 1.00, Pro 3.08, Val 1.04	522 (M-H) <sup>+</sup>
Pro-Pro-Pro-Val	-242 (C=0.4)	Pro 2.94, Val 1.00	409 (M-H) <sup>+</sup>
Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-	-203 (C=0.3)	Pro 6.3, Arg 0.8, Gln 2.0, His 1.7	1287 (M-H) <sup>+</sup>
Pro-Gln-Pro-His-Pro	-169 (C=0.4)	Lys 0.89, Pro 2.06	440 (M-H) <sup>+</sup>
Lys-Pro-Pro-Val	-167 (C=0.3)	Val 1.00, Lys 1.00, Pro 1.94	454 (M-H) <sup>+</sup>
Lys-Pro-Pro-Ile	-192 (C=0.5)	Ile 1.12, Thr 1.00, Pro 2.07	413 (M-H) <sup>+</sup>
Thr-Pro-Pro-Val		Val 1.00	

【0034】

【表2】

*F. meningosepticum* 由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性

ペプチド	濃度 (μM)	阻害率 (%)
Val-His-Leu-Pro-Pro-Pro	800	31
Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	800	12
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	80
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-	400	88
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	39
Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	26
Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-	400	14
Pro-Gln-Pro-His-Pro	400	65
Lys-Pro-Pro-Val	400	52
Lys-Pro-Pro-Ile	400	12
Thr-Pro-Pro-Val	400	

【0035】

【表3】

*F. meningosepticum* 由来プロリルエンド  
ペプチダーゼに対する阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値)

ペプチド	IC <sub>50</sub> 値 (μM)
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	80
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-	
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	30
Leu-Pro-Pro-Pro-Val	500
Lys-Pro-Pro-Val	270
Lys-Pro-Pro-Ile	380

【0036】

【表4】



## 牛乳由来プロリルエンドペプチダーゼに対する阻害活性

ペプチド	濃度 ( $\mu$ M)	阻害率 (%)
Val-His-Leu-Pro-Pro-Ile-Pro	400	65
Leu-Pro-Pro-Pro-Val-His	400	68
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	28
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val-		
His-Leu-Pro-Pro-Pro-Val	400	64
Pro-Arg-Pro-Gln-Pro-His-		
Pro-Gln-Pro-His-Pro	400	71

【0037】

エンドペプチダーゼ阻害剤が提供される。

【発明の効果】本発明によって新規かつ有用なプロリル

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

序内整理番号

F 1

技術表示箇所

C 0 7 K 99:00

(72)発明者 田中 秀興

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

(72)発明者 前田 英勝

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

(72)発明者 三吉 新介

千葉県船橋市日の出2丁目20番2号 昭和産業株式会社総合研究所内